

## 大麦赤霉病抗性种质的挖掘及其小孢子对DON毒素胁迫培养的响应

高润红<sup>1,2</sup>, 郭桂梅<sup>1,2</sup>, 何婷<sup>1,2</sup>, 陈志伟<sup>1,2</sup>, 徐红卫<sup>1,2</sup>, 李颖波<sup>1,2</sup>, 刘成洪<sup>1,2</sup>, 陆瑞菊<sup>1,2,\*</sup>, 黄剑华<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>上海市农业科学院生物技术研究所, 上海201106; <sup>2</sup>上海市农业遗传育种重点实验室, 上海201106

**摘要:** 采用单花滴注法将禾谷镰刀菌分生孢子接种42份大麦品种(系), 对其赤霉病菌的抗性进行评价, 并利用DON毒素对抗性不同大麦的小孢子进行离体胁迫培养。结果表明, 供试品种(系)对赤霉病抗性存在明显差异, 可将其划分为高抗、中抗、中感和重感四种类型。在5 mg·L<sup>-1</sup> DON毒素的胁迫下, 抗性不同的大麦小孢子的愈伤组织相对产量为高抗>中抗>高感, 表明供试品种小孢子水平的耐DON毒素能力与植株水平的抗赤霉病能力之间存在一定的联系。

**关键词:** 大麦; 赤霉病; DON毒素; 小孢子; 愈伤组织相对产量

## Evaluation of the Resistance of Barley Varieties (Lines) to *Fusarium* Head Blight and Responses of Isolated Microspores to Deoxynivalenol Stress

GAO Run-Hong<sup>1,2</sup>, GUO Gui-Mei<sup>1,2</sup>, HE Ting<sup>1,2</sup>, CHEN Zhi-Wei<sup>1,2</sup>, XU Hong-Wei<sup>1,2</sup>, LI Ying-Bo<sup>1,2</sup>, LIU Cheng-Hong<sup>1,2</sup>, LU Rui-Ju<sup>1,2,\*</sup>, HUANG Jian-Hua<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; <sup>2</sup>Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

**Abstract:** The *Fusarium* head blight (FHB) resistance of different barley varieties (lines) were investigated by single floret injection. The results showed that there were significant differences among barley varieties (lines) for FHB resistance, which could be categorized into four groups: highly resistant, moderately resistant, moderately susceptible and highly susceptible. Responses of barley isolated microspores cultured by deoxynivalenol (DON) treatment were further investigated. The relative callus yields from isolated microspores of barley varieties (lines) with different levels of FHB resistance were obviously different. When cultured in induction medium supplemented by 5 mg·L<sup>-1</sup> DON, highly resistant line had the highest yield, followed by moderately resistant line, and highly susceptible had the lowest yield. These results suggested that the response of cultured microspores to DON stress had correlation with FHB resistance.

**Key words:** barley; *Fusarium* head blight (FHB); deoxynivalenol; microspore; relative callus yield

赤霉病主要是由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)引起的, 是小麦、大麦以及其他禾谷类作物世界性病害(Ito等2012)。赤霉病对谷物的产量、品质以及食品安全方面具有多重威胁。在湿热的流行年份不仅严重减产, 而且降低谷物的品质, 感病的籽粒中含有多种真菌毒素, 特别是脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON), 其生物活性和毒力最强, 误食后对人类和动物都有严重危害(汪军妹等2005; Kang等2013)。改善栽培措施对控制赤霉病的流行收效甚微, 化学防治不仅增加成本, 而其带来的环境污染问题也引起了广泛的关注, 因此利用抗病品种是控制赤霉病经济而环保的方法(Mardi等2004; 吴佳祺等2011; 朱展望等2014)。

大麦赤霉病是我国中下游麦区的主要病害,

不仅导致大麦大面积减产, 而且使品质严重变劣, 直接影响到籽粒的加工和营养品质。若病麦粒用于酿造, DON等毒素会引起啤酒喷涌, 而且毒素会逐渐释放影响人类健康(汪君妹等2005)。我国明确规定大麦赤霉病病粒率不能超过4%。由于大麦赤霉病的发生流行程度和抗性鉴定结果受诸多因素影响, 准确可靠的鉴定方法对于抗源的筛选尤为重要(吴佳祺等2011)。利用单倍体技术获得DH群体可以获得所有性状一次性纯合的育种材料,

收稿 2015-10-14 修定 2015-11-12

资助 上海市科委基础研究项目(14JC1405300)、上海市农委成长计划[沪农青字(2015)第1-29号]和大麦青稞产业技术体系(CARS-05)。

\* 共同通讯作者(E-mail: sw1@saas.sh.cn, Tel: 021-62201032; E-mail: luruiju62@163.com, Tel: 021-62202965)。

缩短表型筛选的时间, 大大提高育种效率。目前利用花药培养体系进行抗赤霉病单倍体细胞筛选已经有一些进展。Fadel和Wenzel (1993)的研究表明, 双亲耐赤霉病力低的F<sub>1</sub>花药比双亲耐赤霉病力高的对离体培养中粗毒素更敏感; 陈耀峰等(1997)研究表明, 小麦感病品种和含感病基因的杂种花药对毒素较为敏感; 郭新梅等(2003)的研究也证实含感病基因的小麦杂种花药对禾谷镰刀菌毒素更敏感。笔者实验室的初步研究表明, 大麦个体水平的耐、感赤霉病性与花药水平对赤霉病粗毒素反应具有一致性(孙月芳等2005)。

小孢子是单倍体、单细胞培养系统, 定向设置各类胁迫处理, 从理论上讲, 可以获得耐逆、抗病、强生长势的存活小孢子, 经染色体加倍后, 再生植株的这些优良性状可以一次性纯合。通过大田的一次性鉴定, 即可定向地获得理想纯合植株(株系)(黄剑华2007)。小孢子对胁迫响应更为敏感, 再生植株100%为单倍体或加倍单倍体, 其为真正意义上单倍体细胞遗传改良工程。业已成熟的大麦高效的游离小孢子培养系统尚未应用于抗赤霉病育种。建立小孢子相应毒素胁迫技术, 不但可为研究DON毒素胁迫下游离小孢子实现细胞全能性的分子机制提供有效的实验系统, 同时小孢子培养结合DON离体筛选还有望成为抗赤霉病育种的有效技术手段。

本研究对一批适应江、浙、沪种植的大麦品种(品系)进行赤霉病抗性鉴定, 从中筛选抗病种质材料, 用于大麦抗病育种; 同时筛选高感和高抗材料, 用于抗病性的遗传调控研究。本文报道赤霉病抗病性存在较大差异的大麦种质材料的挖掘及其小孢子水平耐毒素能力与植株水平的抗病性存在一定联系的实验结果。

## 材料与amp;方法

### 1 供试材料

大田赤霉病抗性鉴定2011~2012和2012~2013年在上海农业科学院青浦实验基地进行。42份大麦(*Hordeum vulgare* L.)品种(系)供试材料由上海市农业生物基因中心提供(考虑到种质材料用于相关机理的研究正在进行之中, 论文中的品种以编号注明)。抗感材料的小孢子毒素胁迫培养以‘基

6’、‘基19’和‘基42’为供试材料, 2014年秋播, 2015年春季进行小孢子培养。

## 2 方法

### 2.1 大田赤霉病抗性鉴定

在大麦开花期采用单花滴注法进行人工接种, 接种的菌株为F0609, 由南京农业大学王秀娥教授提供。接种菌株在盛有灭菌的4%绿豆汤的三角瓶中, 25 °C, 200 r·min<sup>-1</sup>, 培养2~3 d, 接种前加无菌水稀释, 接种浓度为在血小球计数板法10倍显微镜视野下含20个左右分生孢子。在大麦穗子中部选取一侧小穗, 剪去颖尖, 注射10 μL菌液, 套袋保湿2 d, 每个材料接种5株, 接种21 d后调查发病情况, 统计每穗发病小穗数和总小穗数, 计算病小穗率。以病小穗率作为赤霉病抗性评价指标, 小于10%为高抗株系, 10%~20%之间的为中抗株系, 20%~40%之间的为中感株系, 大于40%的为高感株系(戈和静等2006)。病小穗率(%)=(病小穗数/总小穗数)×100。

### 2.2 小孢子的游离与培养

从大田选取中部小花小孢子发育处于单核早期、中期的穗子, 放入5 °C冰箱冷藏15 d。接种时, 穗子用饱和的漂白粉溶液消毒15 min, 无菌水冲洗3~4次。每个试管接10个穗子, 倒入15 mL提取液, 用高速分散器超速旋切, 150目筛网过滤, 滤液以800 r·min<sup>-1</sup>低速离心5 min, 重复3次, 收集小孢子。小孢子用提取液于25 °C、黑暗预处理2 d。培养前将小孢子先用21%麦芽糖纯化, 再用培养基洗涤1次, 然后用培养基将小孢子密度调节至1.0×10<sup>5</sup>个·mL<sup>-1</sup>, 取1 mL小孢子悬浮液接种于培养皿(35 mm×15 mm), Parafilm封口, 25 °C暗培养2 d, 培养18 d时吸干液体培养基, 称取愈伤组织重量。

### 2.3 小孢子的提取液与诱导培养基

提取液: 6%甘露醇溶液, 添加CaCl<sub>2</sub> 1.1 g·L<sup>-1</sup>和MES 0.976 g·L<sup>-1</sup>。

诱导培养基: 以改良的N<sub>6</sub>培养基为基本培养基, 其中添加KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>、水解干酪素400 mg·L<sup>-1</sup>、谷氨酰胺1 600 mg·L<sup>-1</sup>和麦芽糖90 g·L<sup>-1</sup>。

DON胁迫诱导培养基中还分别添加有DON 5、10、15、20和25 mg·L<sup>-1</sup>。

提取液和诱导培养基均过滤灭菌, pH为5.8。

## 实验结果

### 1 大田赤霉病抗性鉴定结果

在接种的42份材料中,其中,‘基23’、‘基24’和‘基25’因农艺性状太差而被淘汰,剩余的39份材料根据开花期的早晚分别进行接种,两年的鉴定结果见表1。以病小穗率作为赤霉病抗性评价指标,2011~2012年鉴定材料中,病小穗率小于10%的高抗材料有8份,占总数的20.5%,病小穗率在10%~20%之间的中抗材料有13份,占总数的33.3%;病小穗率在20%~40%之间的中感材料有6份,占总数的15.4%;病小穗率在40%以上的高感材料有12份,占总数的30.8%,未发现免疫的材料。2012~2013年对其中的30份材料进行再次鉴定,高抗材料有4份,占13.3%;中抗材料有14份,占46.7%;中感材料5份,占16.7%;高感材料7份,占23.3%。从上述结果看出,一半左右的材料都不具有赤霉病抗性,可见大麦赤霉病抗性的改良不容忽视。综合两年的鉴定结果,抗病性一致的材料共有13份,其中高抗材料2份,为‘基1’和‘基6’;中抗材料5份,分别为‘基27’、‘基34’、‘基36’、‘基41’和‘基42’;高感材料6份,分别为‘基15’、‘基19’、‘基22’、‘基31’、‘基33’和‘基39’。‘基1’和‘基6’在两年的鉴定结果中抗性表现稳定,可作为大麦赤霉病抗性改良的抗源。稳定明确的高抗和高感材料也可用于大麦赤霉病分子机制研究(图1)。

### 2 抗感材料的小孢子毒素胁迫培养

对3份抗赤霉病性不同的大麦材料的小孢子在添加不同浓度的DON的诱导培养基中培养,从表2中可以看出,随着DON毒素浓度的升高,愈伤产量急速下降。当诱导培养基中DON浓度为5 mg·L<sup>-1</sup>时,这3份材料均有愈伤组织产生,当DON浓度增加至10 mg·L<sup>-1</sup>时,只有高抗材料‘基6’有愈伤组织产生,而中抗‘基42’和高感‘基19’均无愈伤组织产生(图2);当DON浓度大于10 mg·L<sup>-1</sup>时,这3份材料均无愈伤组织产生。由于供体的基因型对小孢子诱导愈伤效果有较大影响,为了消除这种影



图1 不同类型抗性田间表现

Fig.1 Different types of FHB resistance in the field

表1 大田赤霉病鉴定结果

Table 1 The evaluation of FHB resistance in the field

年度	鉴定份数	高抗材料		中抗材料		中感材料		高感材料	
		份数	比例/%	份数	比例/%	份数	比例/%	份数	比例/%
2011~2012	39	8	20.5	13	33.3	6	15.4	12	30.8
2012~2013	30	4	13.3	14	46.7	5	16.7	7	23.3

表2 不同浓度毒素胁迫下不同抗性材料小孢子愈伤组织产量

Table 2 The callus yields from isolated microspores of barley varieties (lines) with different types of FHB resistance by stress with different DON concentrations

材料	赤霉病抗性	诱导培养基中DON浓度/mg·L <sup>-1</sup>					
		0	5	10	15	20	25
‘基6’	高抗	77.1±5.78	35.3±7.07	12.4±1.87	0	0	0
‘基19’	高感	48.0±3.48	4.0±0.35	0	0	0	0
‘基42’	中抗	56.3±1.68	8.0±1.73	0	0	0	0



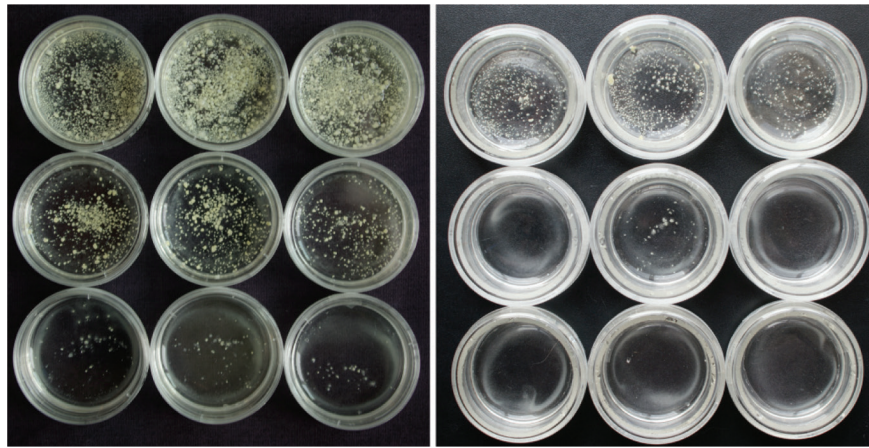


图2 不同浓度毒素胁迫对‘基6’(左)和‘基19’(右)小孢子愈伤组织产量的影响  
Fig.2 Effect of different DON concentrations on callus yields from microspore culture of ‘Ji 6’ (left) and ‘Ji 19’ (right)  
DON浓度从上到下依次为0、5、10 mg·L<sup>-1</sup>。

响, 比较了5 mg·L<sup>-1</sup>和10 mg·L<sup>-1</sup>这两个浓度下愈伤产量与各自对照的比值, 如图3所示。3份材料在5 mg·L<sup>-1</sup> DON处理下愈伤产量的相对值为‘基6’>‘基42’>‘基19’, 对愈伤产量的相对值和其相应的病小穗率进行相关分析, 相关系数为-0.728, 呈显著负相关, 即病小穗率越小愈伤产量相对值越大, 与其对应的赤霉病的抗性越好。在10 mg·L<sup>-1</sup> DON处理下, 只有高抗材料‘基6’产生愈伤组织, 因此可以

将10 mg·L<sup>-1</sup> DON作为一个筛选压进行高抗赤霉病材料的筛选。

## 讨 论

解决赤霉病危害的根本的途径是培育抗病品种, 而筛选和创制抗源又是抗病品种培育的关键。目前还未发现完全免疫的品种(杨文新等2002; 戈和静等2006), 但不同的大麦品种(系)之间具有明显差异。我们利用单花滴注方法经过两年的重复鉴定, 发现两份高抗赤霉病的大麦品种, 它们在不同的发病条件下均表现较好的抗性, 可以通过育种手段使不同的抗病基因积累, 筛选出综合性状好的抗赤霉病品种。抗病和感病的材料的获得为我们提供了很好的遗传研究材料, 可以用来揭示大麦赤霉病抗病和感病的分子机制。

赤霉病的抗性评价和发生率主要依据每个穗子上的病小穗率和被侵染的穗数。尽管这种方法已经被广泛用来筛选抗性种质, 但是所得到的结果具有主观性(Kang等2013)。麦类赤霉病多发生于盛花期, 湿热高温的天气, 由于温湿度的变化, 导致麦类作物赤霉病年度间和地区间的差异, 在一定程度上掩盖品种本身的抗赤性, 对赤霉病育种的选择造成困难(陆维忠等1998)。许多研究证明了DON参与病菌的致病过程, 是重要的致病因子, DON在禾谷镰刀菌的定殖、侵染和致病过程中起着重要的作用(刘宗镇等1993; 俞刚等2003; 刘志林等2005)。随着小孢子培养系统的完善, 以

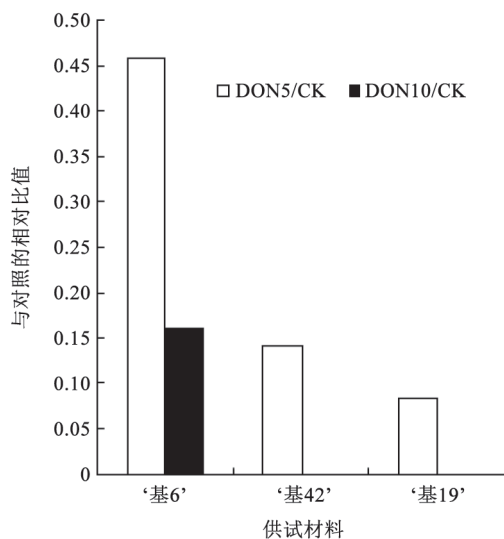


图3 不同浓度毒素胁迫下不同抗性材料小孢子愈伤组织产量相对值比较

Fig.3 The comparison of callus relative yields from isolated microspores of barley varieties (lines) with different types of FHB resistance by the stress with different DON concentrations

DON作为筛选剂进行赤霉病抗性的离体筛选以及抗赤霉病育种的已成为一种有效的技术手段。

小孢子水平的耐赤霉毒素定向筛选,可以提高目标配子体的检出率。与花药胁迫培养筛选方法相比,游离小孢子脱离了花药壁的保护,直接置于离体培养环境,诱导形成的胚状体和再生植株的抗逆性比花药培养的更强,更易产生新颖种质材料。同时,在毒素胁迫下,游离小孢子培养的存活、脱分化、分化力可以反映其实现细胞全能性的能力,并且揭示这种能力与供体植株水平抗赤霉病能力之间的相关性,可以为进一步的分子机制研究提供依据,同时论证小孢子胁迫筛选的有效性。在本研究中,我们利用不同抗性材料的小孢子在含有不同浓度的DON毒素的诱导培养基中培养,在 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DON处理下,不同材料愈伤产量的相对值抗病材料最高,感病材料最低,该结果证明了在小孢子水平上的抗毒素能力与植株水平上的抗赤霉病能力具有相关性,而且抗病材料在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DON处理下能够产生愈伤组织,该浓度可以作为筛选抗病材料的一个筛选压,可以定向选择些具有高抗赤霉毒素能力的基因型,提高抗赤霉基因型的筛选率。我们进一步会在 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间进行浓度筛选,将不同抗病类型的材料区分开,建立更为完善的离体筛选赤霉病抗性技术体系,为大麦抗赤霉病育种提供一个有效的方法。

### 参考文献

- 陈耀锋,任惠莉,韩德俊,李春莲,崔传斌(1997). 离体培养的小麦花药对镰刀菌毒素反应之研究. 西北农业学报, 6 (2): 23~26
- 戈和静,马鸿翔,陆维忠,陈和,陈建民(2006). 大麦赤霉病抗扩展性鉴定与评价. 植物遗传资源学报, 7 (4): 409~414
- 郭新梅,陈耀锋,任惠莉,郭东伟,李春莲(2003). 禾谷镰刀菌毒素对小麦花药培养特性的影响研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 31 (5): 5~8
- 黄剑华(2007). 小孢子和花药培养技术在作物定向遗传改良上的应用. 作物研究, 3: 167~169
- 刘志林,陈怀谷,陈厚德,林玲,王裕中(2005). DON毒素作用后小麦愈伤组织盐溶性蛋白质变化. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 26 (3): 70~73, 82
- 刘宗镇,陆仕华,黄晓敏,姚泉洪,魏春妹,薛伟龙(1993). DON毒素的类生长激素活性与小麦赤霉病. 上海农业学报, 9 (2): 92~96
- 陆维忠,程顺和,沈晓蓉,周朝飞,章静娟,王裕中(1998). 细胞工程在小麦抗赤霉病育种中的利用. 江苏农业学报, 14 (1): 9~14
- 孙月芳,陆瑞菊,王亦非,周润梅,黄剑华(2005). 不同基因型大麦离体培养花药对赤霉菌粗毒素的反应. 核农学报, 19 (3): 172~174
- 汪军妹,沈秋泉,杨建明,陶跃之,朱靖环(2005). 大麦赤霉病抗性研究进展. 大麦科学, 2: 1~4
- 吴佳祺,朱靖环,汪军妹,贾巧君,林峰,杨建明(2011). 大麦赤霉病抗扩展性及其与农艺性状相关性评价. 浙江农业学报, 23 (2): 215~220
- 杨文新,沈秋泉,杨建明,汪军妹(2002). 大麦赤霉病抗性研究及其抗源开拓. 麦类作物学报, 22 (2): 91~93
- 俞刚,陈利锋,姚红燕,柴一秋(2003). 脱氧雪腐镰刀菌烯醇在小麦赤霉病病程中的作用. 植物病理学报, 33 (1): 40~43
- 朱展望,杨立军,佟汉文,唐道廷,刘易科,汪华,陈冷,张宇庆,高春保(2014). 湖北省小麦品种(系)的赤霉病抗性分析. 麦类作物学报, 34 (1): 137~142
- Fadel F, Wenzel G (1993). *In vitro* selection for tolerance to *Fusarium* in  $F_1$  microspore populations of wheat. Plant Breeding, 110 (2): 89~95
- Ito M, Sato I, Koitabashi M, Oshida S, Imai M, Tsushima S (2012). A novel actinomycete derived from wheat heads degrades deoxynivalenol in the grain of wheat and barley affected by *Fusarium* head blight. Appl Microbiol Biot, 96 (4): 1059~1070
- Kang WR, Hwang DJ, Bea SC, Lee T, Kim S, Ahn IP (2013). Evaluation of *Fusarium* head blight in barley infected by *Fusarium graminearum*. J Microbiol, 51 (4): 540~543
- Mardi M, Buerstmayr H, Ghareyazie B, Lemmens M, Moshrefzadeh N, Ruckebauer P (2004). Combining ability analysis of resistance to head blight caused by *Fusarium graminearum* in spring wheat. Euphytica, 139 (1): 45~50